Uma visão técnica para a compreensão e resolução de problemas em sistemas de cromatografia líquida

Álvaro José dos Santos Neto
Editor

Álvaro José dos Santos Neto

Universidade Federal de Alfenas
Departamento de Ciências Exatas
37130-000 – Alfenas (MG)
Brasil
álvaro.santosneto@unifal-mg.edu.br

Resumo

Como apresentado na edição de lançamento da *Scientia Chromatographica*, esse espaço tratará do assunto *Troubleshooting* em cromatografia – o entendimento e a resolução dos problemas mais comuns apresentados pelos sistemas e métodos cromatográficos de análise. Nessa edição, uma introdução à técnica e às estratégias de *troubleshooting* em sistemas e métodos cromatográficos será apresentada. Na segunda parte do artigo haverá a descrição do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com uma visão voltada ao entendimento e prevenção de problemas comumente encontrados.

Palavras-chave
Técnica de *troubleshooting*; cromatografia líquida; CLAE; manutenção em cromatografia.

Abstract

As presented in the release edition of the *Scientia Chromatographica*, this column will deal with Troubleshooting in chromatography – addressing the comprehension and resolution of the usual problems depicted by chromatographic systems and methods of analysis. In this edition, we will present an introduction to the concepts and strategies of the troubleshooting technique, applied for chromatographic systems and methods. In the second part, a description of the high performance liquid chromatographic system will be presented, focusing on the understanding and prevention of the most usual problems that a chromatographist is used to deal with.

Keywords
Troubleshooting technique; liquid chromatography; HPLC; chromatography maintenance.

Como apresentado na edição de lançamento da *Scientia Chromatographica*, esta coluna tratará daquilo que em inglês chama-se *Troubleshooting*, ou seja, de maneira resumida, em português, pode-se compreender esse termo como a identificação e resolução de problemas em um sistema ou processo. Dessa forma, a abordagem de *troubleshooting* em cromatografia tem o objetivo de observar, isolar e corrigir problemas, de maneira direta, simples, racional e eficiente. Adiante, estratégias para a sistematização da identificação e resolução dos problemas serão apresentadas, servindo de guia para a abordagem das falhas que surgirem no decorrer do uso de um sistema cromatográfico ou relacionado. Pretende-se abordar as diversas formas de cromatografia instrumental, por exemplo, cromatografia líquida, gasosa e com fluido supercrítico, bem como os assuntos relacionados a ela (preparo de amostras, tratamento dos dados, acoplamento com outras técnicas). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE para aqueles que gostam do termo em português) está presente como ferramenta de análise nos mais diversos laboratórios e, dessa forma, será a primeira a receber a nossa atenção.

Para que o usuário da técnica torne-se um profissional (*cromatografista*) mais capacitado e prontamente apto para atuar na identificação e resolução de problemas, uma compreensão do funcionamento de cada parte do sistema de cromatografia é imprescindível. Por essa razão, nesse primeiro artigo, haverá uma discussão relativamente detalhada dos princípios de funcionamento e operação de cada parte de um HPLC, bem como serão indicados os problemas mais comuns que ocorrem em cada parte. Obviamente, seria praticamente impossível endereçar cada um dos eventuais problemas que podem ocorrer em cada parte de um sistema HPLC, da mesma forma, uma discussão detalhada de cada problema reconhecido resultaria em um livro sobre resolução de problemas em HPLC. Nessa coluna, tentaremos abordar, ao longo do tempo, os aspectos mais relevantes que forem considerados pelo editor, contando com a grande colaboração, sugestão e crítica dos leitores/colegas cromatografistas. Conforme necessário, um pouco da teoria da cromatografia será apresentada como subsídio para a compreensão e resolução de problemas específicos que estiverem sendo discutidos. Acreditamos que a compreensão dos fundamentos básicos da teoria e técnica da HPLC são os requisitos que juntamente com a experiência adquirida habilitam um cromatografista para atuar com propriedade, tanto em análises de rotina quanto nas áreas de pesquisa.

Quando há um problema? O que fazer nesse caso?

Antes de adentrar ao assunto da técnica de HPLC, gostaria de destacar os fundamentos da técnica de *Troubleshooting*. O primeiro passo para resolvermos um problema é sabermos que estamos diante de um. Ou seja, precisamos da resposta para a pergunta "Quando há um problema?". Para isso, precisamos reconhecer o funcionamento normal do nosso equipamento, de maneira a reconhecer quando algo de anormal vem a surgir. É prática recomendada em qualquer laboratório, mesmo que não exigida pela rotina, manter um caderno com anotações sobre o funcionamento do equipamento. Da mesma forma, é interessante ter um conjunto de condições padrão de uso, sob o qual se obtém determinado resultado. Por exemplo, com uma determinada coluna e ao utilizar-se certo método, obtém-se um reconhecido cromatograma para a mistura teste, bem como o registro de certo intervalo de pressão para a coluna. Os sentidos do cromatografista também são importantes ferramentas no reconhecimento de problemas: ruídos ou vibrações anormais podem ser indícios de peças desgastadas, mal lubrificadas, quebradas, mal colocadas etc.; vazamentos ou bolhas podem ser visualmente detectados, bem como as anormalidades reportadas pelo cromatograma; um eventual aquecimento ou liberação de odor característico pode indicar a ocorrência de queima ou superaquecimento de placas ou componentes eletrônicos.

Ao reconhecer o problema, "O que fazer nesse caso?", primeiramente, é importante saber se ele pode ser resolvido pelo próprio cromatografista ou se haverá a necessidade de assistência técnica especializada. Muitos procedimentos podem ser realizados pelo próprio cromatografista e são inclusive listados e descritos nos manuais de operação e manutenção rotineira dos equipamentos. Por outro lado, outros procedimentos fazem parte apenas dos "manuais de serviço" restritos aos técnicos especializados e treinados para manutenções mais avançadas. O cromatografista deve reconhecer até onde pode atuar e quando chega a hora de pedir socorro a um profissional habilitado para fazer a manutenção daquele equipamento.

As sugestões que serão apresentadas nessa coluna, serão de caráter genérico. Apesar de culturalmente as instruções de uso dificilmente serem lidas, deve ser entendido que as sugestões apresentadas aqui não se prestam a substituir os manuais de uso e manutenção dos equipamentos. Esses manuais contêm informações específicas e detalhadas para o equipamento, de uma determinada marca e modelo, em

particular. Por exemplo, em um procedimento de manutenção, um manual de boa qualidade traz diagramas com vista explodida e procedimento passo a passo para acessar um determinado problema.

Ao efetuar modificações no hardware do equipamento, tudo deve ser devidamente anotado e sistematizado. Por exemplo, ao se suspeitar de mau funcionamento de uma *check valve*, a flutuação de pressão deverá ser registrada, a válvula marcada, trocada e então a pressão aferida e comparada com a anteriormente registrada. Imagine a dor de cabeça causada por não se marcar uma *check valve* defeituosa que foi substituída e posteriormente utilizá-la como peça de reposição ao se fazer a manutenção preventiva de outro HPLC. O registro dos procedimentos de manutenção tem uma vantagem adicional, pois servem como referência quando um problema similar voltar a ocorrer.

Em tempo, é importante destacar que, apesar de algumas pessoas associarem o acrônimo HPLC com "High Problem Liquid Chromatography", um sistema bem cuidado, com manutenções preventivas bem executadas e em dia, dificilmente terá problemas de hardware complicados de serem resolvidos.

Os fundamentos da Técnica de *Troubleshooting*

Dentre os objetivos da técnica de *troubleshooting*, estão incluídos: a identificação dos problemas tão logo ocorram; a pronta localização da(s) causa(s); a solução rápida do problema. É importante, ainda, que o procedimento seja documentado para que uma nova ocorrência seja mais facilmente identificada e resolvida. Como comentado anteriormente, a observação cuidadosa do bom funcionamento do equipamento é um excelente termômetro para saber quando algo de errado surge no sistema ou nos resultados esperados. Essa técnica de isolamento e solução de problemas baseia-se na sistematização, de maneira lógica, da busca pelo problema. As principais estratégias adotadas seguem a seguir:

1. Uma mudança de cada vez

A abordagem do problema deve ser feita de maneira lógica e sequencial. Cada alteração ou substituição de componente ou peça deve ser feita individualmente para que então outra possibilidade seja avaliada. Apesar da realização de mudanças e testes individuais soar como uma perda de tempo, essa é a melhor maneira de se isolar o problema, reconhecendo-o e resolvendo-o. Algumas vezes, um laboratório não tem tempo para tal procedimento, nesse caso, uma revisão completa da parte sob suspeição, no sistema, é realizada. Se o problema realmente estiver localizado naquele módulo ou parte, provavelmente será resolvido, porém à custa de um dispêndio de recursos maior e sem a compreensão do que realmente causou o problema. Se a causa do problema for sistemática, não se saberá como preveni-la, correndo-se o risco de haver recorrência, obrigando a uma nova intervenção. Um exemplo clássico é a troca da coluna ou pré-coluna quando se apresenta um aumento de pressão no sistema de LC. Nem sempre essa é a estratégia que surte efeito e não é a maneira mais eficiente de iniciar os testes de *troubleshooting*. O isolamento da linha do solvente, ponto a ponto e sequencial, entre a bomba e o detector, poderia rapidamente resolver o problema. Um filtro entupido após a bomba, ou mesmo uma válvula de injeção parcialmente obstruída poderiam ser a causa do problema, evitando a substituição desnecessária de uma coluna ou pré-coluna.

2. Confirme a presença do problema e a sua solução

Ao deparar com um problema, é importante que este seja confirmado por uma segunda injeção, antes que mudanças no método ou sistema comecem a ser feitas na busca pela sua causa. Às vezes, um artefato cromatográfico causado por uma bolha de ar esporádica pode levar à caça pelo problema, quando ele não mais está presente. Da mesma forma, é importante confirmar se a mudança feita no sistema ou método, ao se abordar um problema, é realmente efetiva, antes de se partir para um novo teste. Um exemplo que leva muitos cromatografistas em busca de problemas no método, preparo de amostras ou soluções de padrões é o aparecimento de picos inesperados em corridas cromatográficas com gradiente. Algumas vezes, esse(s) pico(s) pode(m) ser decorrentes de contaminante(s) presentes na água ou solventes orgânicos utilizados, e não aparece(m) em separações isocráticas. No uso de gradiente, um contaminante pode ser pré-concentrado no início da corrida cromatográfica, quando a fase móvel não tem força suficiente para eluí-lo, e então, ao se iniciar a rampa do gradiente, ele será eluído na forma de um pico cromatográfico inesperado. Para observar-se que o problema não é diretamente relacionado com o método aplicado às amostras ou padrões, bastaria teste com uma corrida cromatográfica em que não se faz injeção alguma.

3. Substitua a parte sob suspeição por outra reconhecidamente boa

Um teste rápido e eficiente de ser feito em laboratórios com mais de um equipamento (ou com peças de reposição disponíveis) é a substituição de parte ou módulo por outro que sabidamente apresenta bom funcionamento. A troca de um detector, em casos de problemas com a linha de base, por exemplo, é uma boa forma de indicar se o problema reside naquela parte do sistema. Para essa estratégia, teria inúmeros exemplos pessoais interessantes, que ao longo do tempo, nessa coluna, serão abordados. Uma extensão dessa estratégia é a devolução da parte substituída quando essa mudança não resultar na resolução do problema. Digamos que a parte substituída seja uma *check valve* ou lâmpada do detector. A parte usada deverá ser retornada, para evitar um acúmulo de peças ou partes que ainda não esgotaram a sua vida útil. Exceções para esse caso são as partes que apresentam dano irreparável quando são substituídas (por exemplo, alguns selos) ou partes que já se aproximavam do momento da substituição em procedimentos de manutenção preventiva.

4. Tenha condições de referência

Como mencionado anteriormente, tenha referências para saber se o desempenho do LC está adequado. Por exemplo, uma mistura teste conhecida é geralmente adequada para avaliar se uma coluna está funcionando apropriadamente ou se apresenta problemas em sua eficiência de separação.

5. Mantenha anotações

Conforme recomendado anteriormente, as anotações dos procedimentos de *troubleshooting* funcionam como referência para problemas que possam surgir posteriormente. Recomendamos dois tipos de anotação: anotações no formato de um relatório simplificado de *troubleshooting*, em que os testes realizados e suas observações são indicadas, até que o problema seja resolvido (sugere-se o esquema: sintoma, causa e solução, para esse tipo de anotação); anotações temporárias para cada mudança executada. As anotações no formato de relatório servem de referência para todos os cromatografistas do laboratório/empresa, agilizando os procedimentos futuros. O objetivo desse último tipo de anotação é manter controle sobre as mudanças que estão sendo feitas em cada passo do procedimento de verificação do problema. Por exemplo, as pressões devem ser anotadas ao se eliminar cada parte da linha cromatográfica, entre a bomba e o detector, ao se buscar a causa de um problema de elevação da pressão no sistema cromatográfico.

6. Preveja as falhas e atue antecipadamente na manutenção

Algumas pessoas têm a impressão de que a manutenção preventiva é perda de dinheiro, pois antecipa a troca de peças que poderiam durar um tempo a mais. Esse pensamento é certamente falho em laboratórios de rotina/prestação de serviços, e muitas vezes também em laboratórios de pesquisa. Primeiramente, ao se adotar a técnica de *troubleshooting*, as falhas no sistema tornam-se muito mais previsíveis. Além disso, a própria rotina de manutenção sugerida pelo fabricante do equipamento é um indicativo dos pontos que mais merecem atenção. O esquema de manutenção para o equipamento pode ser baseado no tempo de uso de um determinado componente, ou em outro indicativo qualquer (por exemplo, relação sinal/ruído apresentado pelo cromatograma de um padrão analítico, redução na energia da lâmpada, elevação do intervalo de flutuação da pressão das bombas etc.). Ao se estabelecer a manutenção preventiva, ela pode ser agendada para um período mais adequado dentro de uma faixa de alerta/indicativa de manutenção. Esse último aspecto é o que faz a diferença nos custos finais desse procedimento. Imagine um projeto em execução, o qual envolva a análise de centenas ou milhares de amostras. Uma falha no decorrer do projeto, exigindo a manutenção imediata do sistema, poderia implicar na perda dos resultados até então processados, causando prejuízo muito maior do que os gastos com a manutenção preventiva que teria evitado o problema. Em última instância, a manutenção preventiva também evita gastos adicionais desnecessários, decorrentes de falhas secundárias ocasionadas pela falta de manutenção. Por exemplo, pedaços de um rotor (peça do interior de uma válvula injetora) desgastado poderiam ser arrastados pela fase móvel e causar o entupimento de uma coluna; ou o vazamento de fase móvel por um selo desgastado poderia comprometer o sistema eletrônico de um cromatógrafo. Felizmente, existem outros meios de prevenir esses problemas, mas a melhor maneira de se evitar “dores de cabeça” ainda é a manutenção preventiva.

7. Cuidado com as soluções tampão

De tão importante e recorrente, resolvemos dar atenção a um caso concreto nesse último item. O uso de soluções tampão ou contendo eletrólitos (nem sempre a solução preparada é um "tampão" – revejam o conceito de tampão antes de reportarem o uso de um em seus métodos…) é muito comum, especialmente em cromatografia em fase reversa e de troca iônica. A remoção da solução tampão do sistema, quando fora de uso, ou na troca por outro método, não deixa de ser um item preventivo. Algumas dessas soluções podem causar corrosão, abrasão ou mesmo cristalização (levando ao bloqueio das linhas). Outra preocupação é o desenvolvimento de microrganismos devido a soluções tampão em condições fisiológicas, acarretando problemas secundários. A regra nesse caso é a remoção da solução tampão, do sistema e da coluna, quando fora de uso. A solução ideal para esse procedimento deve conter uma composição similar àquela da fase móvel, substituindo a solução tampão por água pura. Deve-se evitar a lavagem do sistema e coluna, previamente usados com soluções salinas, diretamente com 100% de solvente orgânico (principalmente se este for acetonitrila). Um procedimento desse tipo pode levar à precipitação do sal, causando problemas desde a bomba até o detector. Um último cuidado ao se deixar o sistema cromatográfico parado é evitar o preenchimento das tubulações com água pura. O emprego de água nas tubulações também permite o desenvolvimento de micro-organismos, os quais requererão um extensivo procedimento de limpeza e substituições de peças, caso venha a acontecer. Uma forma simples e segura de acondicionar o sistema é a utilização de uma mistura aquoso-alcoólica nas tubulações e linhas do sistema; uma solução contendo mais do que 20% de metanol já é adequada para prevenir esse problema.

A lógica da Técnica de *Troubleshooting* na localização do problema

O uso de procedimentos lógicos na resolução de problemas é a chave do *troubleshooting*. Algumas falhas, como o vazamento de uma conexão, são fáceis de localizar e corrigir. Por outro lado, distorções nos picos cromatográficos podem ser causadas por diversas razões, necessitando-se de procedimentos mais cuidadosos para o isolamento do problema. Para os problemas que não são de óbvia solução, uma abordagem sistemática é importante para que se chegue ao isolamento e correção do real causador do fato por meio de um caminho mais curto do que a simples procura aleatória pela causa do problema.

A. Examine todo o sistema

A primeira etapa ao deparar com um problema é fazer uma varredura rápida de todo o sistema (hardware e método). Inicie a observação do reservatório da fase móvel, seguindo até o descarte do detector, verificando se há alguma causa óbvia que possa ser identificada visualmente ou que possa ser inferida devido às características do método. Procure por vazamentos, bolhas, trocas nas linhas das fases móveis, excesso de pressão, falta de controle de temperatura, rack de *vials* mal posicionado, *vials* com volume insuficiente, equívoco na seleção da coluna etc. Com relação ao método observe o uso equivocado de um método errado, ou falhas na digitação da proporção ou vazão da fase móvel, limites ajustados para as pressões (inferior e superior), erro no ajuste do comprimento de onda do detector ou nas condições de detecção para outros tipos de detectores. Esse deve ser um procedimento rápido, porém muitas falhas do sistema ou do operador são, felizmente, solucionadas diretamente nessa primeira avaliação.

B. Observe as alterações que foram feitas no sistema ou método

Se a falha ou problema não for localizado seguindo o item anterior, determine as mudanças realizadas no sistema ou método e que podem ter dado causa ao fato. Por exemplo, houve algum procedimento de manutenção, houve a reposição de alguma parte ou módulo do sistema, houve mudança no método, trocou-se a fase móvel, ou injetou-se alguma amostra incomum? Nesse item a sugestão de manter-se o registro das alterações e procedimentos realizados no sistema é muito útil. As mudanças realizadas, sob uma análise cuidadosa, podem indicar a causa do problema surgido no sistema. Mesmo que essas mudanças não indiquem a causa do problema, o seu conhecimento pode ajudar na posterior investigação do caso.

C. Teste as condições de referência

Para problemas que causam mudanças no perfil cromatográfico, a injeção de uma mistura de referência pode solucionar o problema. Dessa forma, pode-se relacionar o problema com uma característica da amostra ou do sistema. Se o cromatograma de referência está adequado, o problema está relacionado, de alguma forma, com os procedimentos dependentes da amostra. Por exemplo, a injeção de padrões diluídos em 100% de solvente orgânico, pode apresentar picos duplos ou com ombros; uma injeção

de solução-teste previamente conhecida, e nessas condições conhecidas, resultará em um cromatograma adequado, indicando que a causa dos picos anômalos esta relacionada à amostra, e não com o sistema cromatográfico/coluna. Porém, se ambos os cromatogramas apresentam-se inadequados, algo relacionado ao sistema cromatográfico está causando o problema. Nesse caso, focalize a atenção na localização, passo a passo, da causa do problema

Essa discussão apresentada acerca da técnica de *troubleshooting* deve ser usada em conjunto com o entendimento das fontes/causas de problemas que podem ocorrer em um sistema ou método cromatográfico. A discussão pontual do entendimento e resolução desses problemas específicos em cromatografia será o tema mais recorrente nessa coluna, todavia entendemos que o seu emprego, se baseado nas técnicas e estratégias apresentadas acima, tornará o sucesso mais facilmente alcançável. Em adição a essa coluna, muitos manuais de equipamentos apresentam uma descrição dos problemas mais comuns e suas possíveis causas e soluções. Além disso, alguns catálogos de empresas especializadas em suprimentos para cromatografia apresentam listas resumidas de *troubleshooting* em suas especialidades. Alguns livros em inglês também apresentam uma discussão mais ampla sobre o assunto.[1,2] Em síntese, siga os seguintes passos: mantenha anotações sobre os procedimentos realizados no sistema cromatográfico, amostras injetadas no sistema e na coluna cromatográfica; quando estiver em busca da solução de um problema no sistema cromatográfico, faça apenas uma mudança de cada vez; se a mudança não resolver o problema, via de regra, retorne à configuração original; rotule (como peças usadas) ou descarte as peças substituídas, e identifique a posição correta quando forem removidas temporariamente para algum teste; quando o problema for corrigido e a causa identificada, crie uma pequena nota no caderno de *troubleshooting* relacionando sintoma, causa e solução; requisite peças em substituição às peças do estoque de manutenção que forem usadas; troque informações com seus colegas de laboratório ou grupos de discussão, faça buscas nos registros do caderno de *troubleshooting* do equipamento e consulte a literatura, geralmente outras pessoas já passaram pelos problemas que você está encontrando no momento; ao reconhecer um problema, faça uma varredura em busca da causa, mas não se afaste das regras de *troubleshooting*; não se esqueça de injetar soluções ou testes anteriores que permitam comparar com um cromatograma de referência (idealmente registrado nos cadernos de controle referentes ao equipamento ou à coluna); se necessário, como estratégia para isolamento do problema, substitua módulos ou partes destes, por equivalentes provenientes de equipamentos que estão em adequado funcionamento.

Como a compreensão do funcionamento do sistema de HPLC pode ajudar na solução dos problemas?

A solução de problemas envolvendo cromatografia é mais bem executada quando se compreende o funcionamento do sistema cromatográfico e os princípios que regem a separação. Como visto anteriormente, o sistema cromatográfico, o cromatograma, ou ambos, indicam quando um problema surge. Da mesma forma, a solução do problema é obtida por meio da investigação dos indícios apresentado pelo sistema ou cromatograma. Obviamente, um conhecimento sobre o sistema e sobre a teoria por trás da separação cromatográfica é imprescindível. Do contrário, qualquer mudança feita no sistema, em busca de solução para o problema, não passará de mero procedimento, infundado, de “tentativa e erro”, levando à perda de tempo e dinheiro. Nessa parte do artigo, trataremos de fazer uma apresentação sobre cada parte que geralmente está presente em um sistema de HPLC, apresentando informações necessárias para uma boa compreensão dos procedimentos de *troubleshooting*. Uma visão ainda mais detalhada da instrumentação em HPLC pode ser obtida na referência 1 ou em outros livros especializados.

Para aqueles que não estão familiarizados com muitas marcas e modelos de cromatógrafos líquidos, existem basicamente dois tipos de sistemas, quanto ao arranjo. Há sistema modulares, que podem ser identificados pela presença de módulos distintos para as bombas, desgaseificador, injetor, compartimento para a coluna, detectores etc.; e há sistemas compactos ou monoblocos. Os primeiros geralmente apresentam maior versatilidade de configuração e podem sofrer atualizações/incrementos mais facilmente, dependendo da configuração, ocupam um espaço maior que os equipamentos monoblocos e são caracterizados pelo empilhamento dos módulos. Os últimos costumam ser vendidos para finalidades mais específicas e tem atualização (*upgrade*) relativamente mais difícil, estes encontram boa aplicação em laboratórios com rotina bem definida. Em ambos os

tipos de equipamento os componentes/partes são praticamente os mesmo, mudando apenas o tipo de integração/agrupamento entre eles.

Um trabalho envolvendo separação cromatográfica por HPLC começa antes mesmo de chegar-se à frente do equipamento. A escolha de solventes orgânicos adequados (geralmente descritos como *grau HPLC*), de água ultrapurificada e de reagentes com alto grau de pureza, é imprescindível, especialmente nos casos de análise em gradiente. No preparo da fase móvel a filtração de soluções obtidas a partir da solubilização de solutos sólidos (geralmente soluções tampão) é necessária para evitar que materiais particulados sejam introduzidos no sistema cromatográfico (membranas de 0,22 ou 0,45 µm, compatíveis com a fase móvel, são adequadas a esse procedimento). Além disso, caso o cromatógrafo não possua sistema de desgaseificação integrado, esse procedimento deve ser executado antes da fase móvel ser introduzida no sistema.

A aspersão de um gás inerte (geralmente hélio) na fase móvel é um dos métodos mais eficientes para remoção dos gases dissolvidos na solução.[1] Alguns equipamentos possuem inclusive um sistema de aspersão de hélio integrado. Mais práticos e popularizados atualmente são os sistemas *online* a vácuo integrados ao cromatógrafo e que se baseiam em membranas semipermeáveis ao gás (Fig. 1). Problemas relacionados a uma insuficiente desgaseificação são mais comuns do que se pode imaginar. A tolerância aos gases na fase móvel vai depender sobretudo da sensibilidade da bomba e do detector. O aparecimento de bolhas é mais crítico em misturas orgânico-aquosas (geralmente acetonitrila-água ou metanol-água, em fase reversa, por exemplo), pois a solubilidade dos gases nesse tipo de mistura é menor do que nas soluções orgânica e aquosa separadas. Com esse tipo de mistura podem persistir bolhas na fase móvel após a purga pelos desgaseificadores *online*. Em razão do tamanho das bolhas formadas, algumas delas podem não ser completamente permeadas pelo desgaseificador a vácuo. Nesse caso, uma solução simples é a sonicação da fase móvel por 5 a 10 minutos, antes da introdução no sistema cromatográfico. Apesar da sonicação, por si só, não ser um método de desgaseificação tão eficiente quanto a aspersão de hélio ou a aplicação de vácuo, ela serve para a rápida remoção do excesso de gás insolubilizado no momento da mistura entre o solvente aquoso e o orgânico, auxiliando a etapa *online* posterior. A filtração a vácuo dessa mistura, por membrana filtrante, algumas vezes também resolve o problema do excesso de bolhas de gás.

Figura 1. Desgaseificador *online* a vácuo, o solvente entra no sistema por uma das portas, passa por fina tubulação composta por membrana semipermeável aos gases e sai do sistema em direção à bomba ou válvula seletora do gradiente de baixa pressão.

As fases móveis são geralmente acondicionas em frascos de vidro apropriados (Fig. 2) e colocadas em compartimento adequado, sobre o cromatógrafo. Caso não haja compartimento adequado (geralmente suprido com o cromatógrafo), recomenda-se o emprego de uma bacia retangular que se adapte sobre o equipamento. A colocação de frascos diretamente sobre o equipamento pode levar a acidentes, ocasionando o derramamento de líquido sobre componentes sensíveis do equipamento. Os frascos devem ser tampados para evitar a entrada de material particulado e a contaminação, bem como evitar a evaporação de solventes. Alguns frascos comerciais possuem tampas com filtros de ar, porém essas tampas podem ser facilmente adaptadas no laboratório. Através da tampa deve existir orifício para a entrada do tubo coletor da fase móvel, e em caso de sistema de aspersão de hélio, também para esse. Na entrada do tubo coletor é comum a utilização de um filtro de 10 µm (geralmente de aço inoxidável 316 ou polietileno de altíssima densidade), enquanto na saída do tubo de aspersão de hélio usa-se um “filtro” de 2 µm para a dispersão do gás (Fig. 3).

Figura 2. Exemplo de frasco para acondicionamento da fase móvel.

Figura 3. Exemplos de filtros de admissão de fase móvel.

Na maior parte das bombas, a troca de solventes pode ser feita por um processo de purga, comandada por meio de software ou no painel da própria bomba cromatográfica. Esse procedimento faz com que a fase móvel passe através do tubo de entrada (geralmente um tubo de Teflon® – politetrafluoroetileno – de 1/8”), pelo sistema de desgaseificação *online*, se presente, fluindo até a bomba cromatográfica e sendo desviado, pela válvula de purga, para o descarte. Esse procedimento também pode ser feito manualmente por meio de aspiração com uma seringa comum, adaptada na saída da válvula de purga. Geralmente esse procedimento é necessário e recomendado quando o tubo de entrada e a bomba encontram-se sem fase móvel. A não ser que a bomba seja extremamente robusta, a sucção de grande volume de ar pelo tubo de entrada impede a bomba de realizar a purga automática da fase móvel, requerendo a purga manual. Apesar de esse problema ser de fácil observação, já foi testemunhada, inúmeras vezes, essa ocorrência em laboratórios. Geralmente, esse problema ocorre pela falta de constatação, pelo operador, de que o tubo de entrada está seco. Nesse caso, o operador solicita uma purga automática e não observa se a fase móvel está fluindo pelo tubo de entrada até o descarte. Após esse procedimento de purga, o operador tenta estabelecer um fluxo de fase móvel pela coluna, mas constata que não há elevação da pressão (no caso de utilizar fase móvel composta por apenas um tipo de solvente) ou que há instabilidade da pressão, com repetidas quedas bruscas, (geralmente no caso de utilização de fase móvel binária, ternária ou quaternária). Um procedimento prático para constatar o bom funcionamento das bombas é permitir a entrada de um pequenino segmento de ar através do filtro de entrada no início da purga e acompanhar o seu caminhar pelo tubo até ser eliminado pelo desgaseificador ou ser remetido ao descarte pela válvula de purga.

Apesar de existirem outros tipos de bomba, as mais utilizadas atualmente são aquelas baseadas na combinação de dois pistões reciprocantes (em série (*tandem*) ou em paralelo). Em ambas as bombas o funcionamento do pistão é o mesmo. Movido por um sistema mecânico controlado eletronicamente, o pistão exerce um movimento cíclico de avanço e recuo promovendo o enchimento e esvaziamento da sua câmara. Para a vedação do espaço existente entre a parede da câmara e o pistão, utiliza-se um selo de material elastomérico. Esse selo, para melhor vedação, possui uma mola no seu interior (Fig. 4). A diferença entre as duas bombas está no tamanho dos pistões, no caminho feito pelo solvente e no número de *check valves*. Primeiramente, *check valves* são válvulas de retenção, ou seja, válvulas que permitem o fluxo de solventes em apenas um sentido. Basicamente são válvulas, ativas ou passivas, com uma ou mais esferas em seu interior, e que bloqueiam a passagem da fase móvel quando esta é pressionada no sentido contrário ao fluxo permitido. Na bomba com dois pistões reciprocantes <u>em paralelo</u>, para cada pistão há duas *check valves* uma de entrada e outra de saída. Bem como os pistões, as *check valves* funcionam alternadamente. Enquanto um pistão impulsiona a fase móvel da sua câmara para o sistema cromatográfico, tendo a *check valve* de saída aberta e a de entrada fechada; o outro admite a fase móvel, proveniente do reservatório, em sua câmara, tendo a válvula de entrada aberta e a de saída fechada. Ao chegar ao fim dos seus cursos, os pistões e as válvulas invertem os seus papéis, garantindo um impulsionamento quase contínuo da fase móvel para o sistema. A Figura 5 esquematiza esse tipo de bomba. Nas bombas com pistões <u>em série</u> há apenas um par de *check valves* localizadas na entrada e saída da câmara do primeiro pistão. Esse primeiro pistão geralmente tem o dobro do volume do segundo. Na primeira metade do ciclo, esse primeiro pistão impulsiona a fase móvel do interior da câmara para o sistema cromatográfico, tendo a válvula de saída aberta e a de entrada fechada. Todavia, metade do volume da fase móvel impulsionada, em vez de ser direcionada ao sistema cromatográfico, ocupa-se de preencher o espaço de admissão gerado pelo segundo pistão da série. Ao fim da primeira metade do ciclo de funcionamento, a câmara do segundo pistão está completamente cheia e a do primeiro, vazia; nesse momento ocorre a inversão dos movimentos e das *check valves*. O primeiro, pistão inicia a admissão de nova fase móvel, proveniente do reservatório, enquanto o segundo pistão incumbe-se de impulsionar a fase móvel contida em sua câmara para o restante do sistema. A Figura 6 ilustra esse tipo de bomba.

Figura 4. Exemplos de selo de vedação (vista ampliada) e pistões de safira, usados em bombas de HPLC.
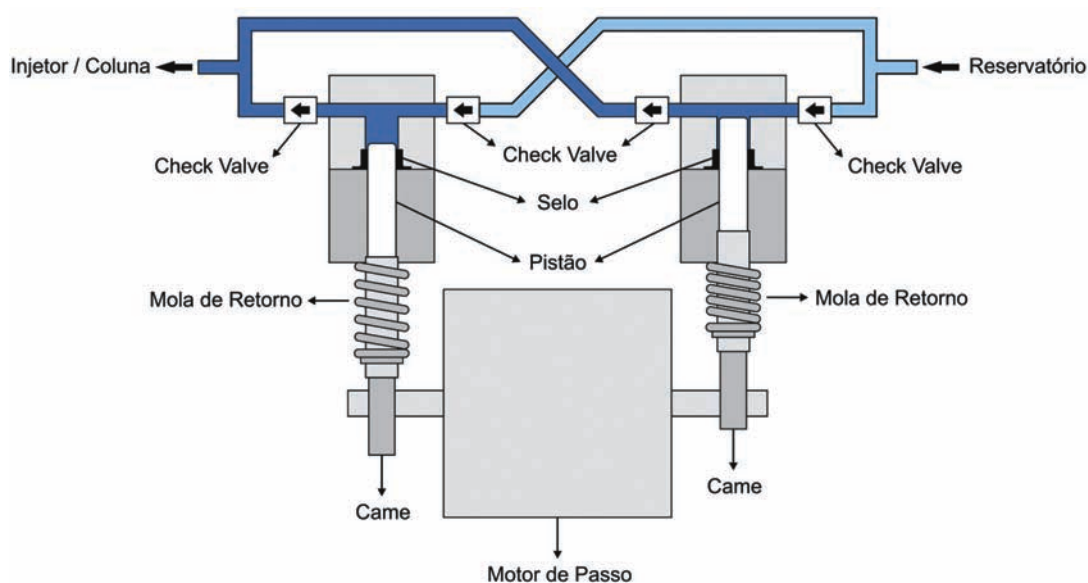
Figura 5. Esquema de bomba do tipo reciprocante de duplo pistão em paralelo. Figura cedida como cortesia pelo Dr. Lincoln F. M. Coutinho[3].
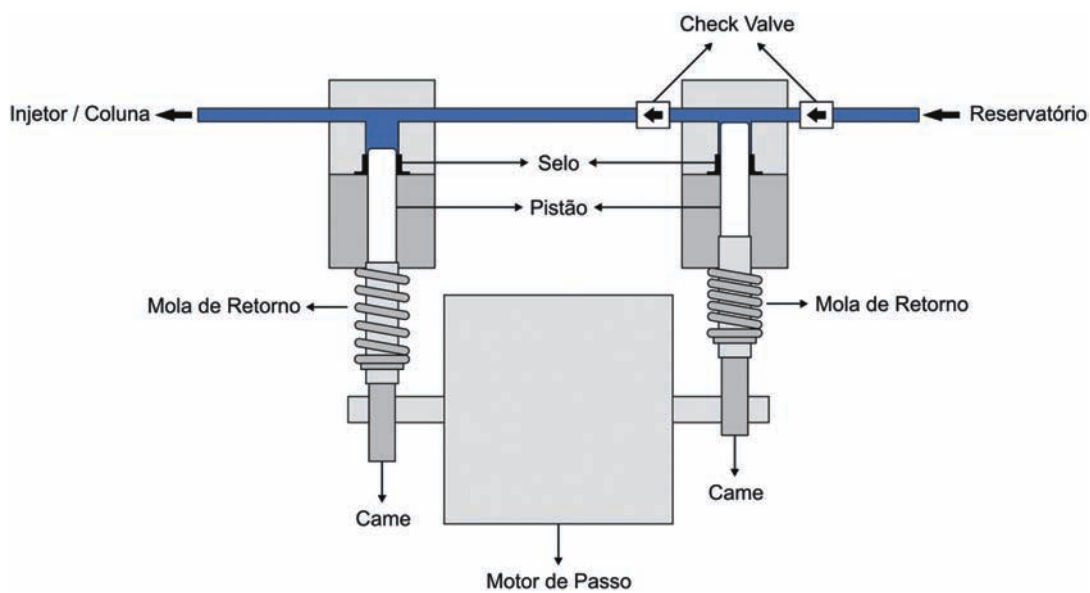
Figura 6. Esquema de bomba do tipo reciprocante de duplo pistão em série. Figura cedida como cortesia pelo Dr. Lincoln F. M. Coutinho[3].

As bombas de pistões seriais são mais baratas e robustas do que aquelas de pistões em paralelo, no entanto, tem inferior qualidade na alimentação do solvente. Geralmente sob um mesmo regime de vazão, a pulsação das bombas com pistões em paralelo é menor do que aquela das bombas seriais. Em vazões convencionais, superiores a 1,0 mL/min, geralmente as duas bombas apresentam desempenhos bastante satisfatórios. Para vazões mais baixas, recomenda-se o emprego de bombas com pistões em paralelo, uma vez que possuem um inferior limite de trabalho, com menor nível de pulsação, esse é o caso comum de sistemas HPLC que alimentam espectrômetros de massas com interfaces do tipo *electrospray*. A manutenção e os problemas mais comuns em uma bomba de HPLC envolvem os selos e as *check valves*. Ambos têm uma vida útil e implicam na estabilidade da pressão exercida pela bomba. Enquanto os selos podem apresentar falhas estruturais e gerar vazamentos, as *check valves* podem apresentar dificuldade na abertura e fechamento, também perturbando a pressão e vazão da fase móvel. Os maiores cuidados exigidos por essas partes da bomba envolvem a limpeza, quanto a materiais particulados presentes na fase móvel. A cristalização dos sais de uma solução tampão pode levar ao desgaste (ranhuras) do selo, a travamentos e desgaste da *check valve* e, em última instância, a quebra dos pistões e danos em sua câmara. Algumas bombas apresentam uma segunda câmara, posterior à câmara de admissão da fase móvel, a qual permite a lavagem do corpo do pistão. Ela é de especial uso quando se faz o emprego contínuo de soluções tampão em altas concentrações. Recomenda-se a utilização de solução aquosa contendo entre 10 e 20 % de metanol para evitar, por um lado, a cristalização dos sais no solvente orgânico, e por outro o crescimento de microorganismos. O principal sintoma indicativo de problemas com selos é a incapacidade de manter a pressão no interior da bomba. Como isso se dá com o vazamento da fase móvel, dependendo do caso pode-se observar esse vazamento. Os problemas com selos costumam ser resolvidos com a sua substituição, é importante escolher o tipo de selo adequado à fase móvel que se utiliza no sistema. No caso das *check valves*, também há manifestação de instabilidade na pressão. Com um exame detalhado é possível identificar qual a válvula problemática e proceder com o seu conserto ou substituição. As *check valves* em caso de mau funcionamento, algumas vezes, podem ser recuperadas por meio da lavagem em banho de ultrassom. Geralmente utiliza-se primeiramente água (podendo estar acidificada com ácido nítrico), uma segunda lavagem com água pura, no caso da lavagem com ácido, e posteriormente um solvente orgânico (metanol ou acetonitrila). Um cuidado adicional é a montagem correta das *check valves*, evitando-se a sua inversão ou troca entre as portas de entrada e saída. Geralmente, na saída da bomba encontra-se mais um filtro, convém observar se há obstrução dele, principalmente quando um problema de elevação de pressão ocorrer exclusivamente em uma das bombas do sistema. Esse tipo de entupimento costuma decorrer da falta de manutenção do sistema de vedação da válvula de purga, o material elastomérico de vedação pode fragmentar-se e obstruir o primeiro obstáculo à sua passagem, no caso, o filtro de saída da bomba. Outras manutenções requeridas pelas bombas são de mais longo prazo e podem envolver a substituição de pistões ou diafragmas, e a limpeza e lubrificação da parte mecânica do acionamento dos pistões. A substituição de pistões e diafragmas pode constar dos manuais de manutenção do usuário, enquanto geralmente a limpeza e lubrificação das partes mecânicas requerem a abertura da bomba e costumam ser feitas por técnico especializado ou com maiores conhecimentos. Eventualmente sensores eletrônicos da posição dos pistões podem falhar e gerar problemas difíceis de serem detectados sob uma primeira inspeção. Nesse caso, a estratégia de substituição dos componentes funciona muito bem para o isolamento do problema. Para maiores detalhes sobre o funcionamento e partes dos diferentes tipos de bombas, sugerimos uma consulta à referência 3, a qual pode ser obtida pela *web*.

Ainda sobre o sistema de bombeamento dos solventes, alguns realizam separações baseadas em fase móvel com composição invariável, ou seja, separações chamadas isocráticas. Enquanto outros utilizam de gradientes entre diferentes fases móveis, as quais podem ser binárias, ternárias ou quaternárias. Os sistemas isocráticos dependem de apenas uma bomba e a mistura adequada para a fase móvel pode ser feita diretamente no recipiente de fase móvel. É evidente que sistemas para gradiente podem também fazer uma mistura isocrática apropriada. Os sistemas para gradiente podem ser de dois tipos (baixa e alta pressão), e seu entendimento é importante para a compreensão de problemas que podem ocorrer. Nos sistemas de baixa pressão, apenas uma bomba é utilizada, porém esta é precedida por uma válvula seletora de fase móvel (composta por válvulas solenoides). A composição final da fase móvel é obtida pela segmentação proporcional dos diferentes solventes, os quais passam pela bomba e tem o término da homogeneização realizada por um misturador. O gradiente é controlado pelo sistema eletrônico, o qual calcula os tempos que cada uma das válvulas solenoides ficam abertas, permitindo que a correta proporção da mistura seja obtida. Os sistemas

com gradiente de alta pressão possuem uma bomba para cada uma das fases móveis misturadas. A proporção entre os solvente é ajustada pela fração da vazão de cada bomba que constitui a vazão total utilizada. As saídas de cada uma das bombas confluem para um misturador que homogeneíza a fase móvel que é destinada para o restante do sistema. Os sistemas com gradientes de baixa pressão são mais baratos, uma vez que utilizam apenas uma bomba e um seletor de solventes, em contraste com o gradiente de alta pressão que precisa de uma bomba para cada solvente da mistura. Por outro lado, aplicações que necessitem de vazões mais baixas e que sejam muito sensíveis a inomogeneidades da fase móvel não apresentam bons resultados com gradiente de baixa pressão. Sob baixas vazões, causa atrasos no gradiente (em razão do volume morto do sistema) podendo inviabilizar a separação e sua repetibilidade, e, além disso, a insuficiente homogeneização causa aumento no ruído da linha de base do cromatograma. Em sistemas de baixa pressão, uma estimativa do volume morto do cromatógrafo deve estar bem clara para evitar problemas de seleção incorreta das condições do gradiente. Muitas vezes, gradientes com colunas de 2,1 mm de diâmetro interno, sob vazão de aproximadamente 0,2 ml/min, acopladas a espectrômetros de massas com detecção por *electrospray* são incompatíveis com sistemas de baixa pressão. Um cuidado adicional com o gradiente de baixa pressão é a correta desgaseificação da fase móvel, como a mistura inicia-se ainda sob baixa pressão, eventuais bolhas de gás podem ser formadas pela menor solubilidade dos gases na mistura orgânico-aquosa, em relação aos solventes não misturados. Uma válvula seletora de solventes composta por quatro válvulas solenoides é representada na Figura 7.

Figura 7. Exemplo de válvula para seleção de solventes em gradiente de baixa pressão.

Após o sistema de pressurização da fase móvel, encontra-se, nos sistemas capazes de elaborar gradientes, um misturador. Esse misturador costuma ter um volume de mistura regulável que deve ser ajustado de acordo com as características de uso do sistema. Um exemplo de ajuste inadequado é a seleção do maior volume de mistura para análises sob gradiente em vazões reduzidas. Atrasos superiores a dez minutos podem ser constatados dependendo da combinação inadequada que for realizada, especialmente em sistemas com gradiente de baixa pressão.

A fase móvel, após deixar a câmara de mistura, é destinada ao sistema de injeção. Convém ressaltar que toda a linha da fase móvel, após a bomba, deve ser resistente às pressões utilizadas para a obtenção de adequada vazão pela coluna cromatográfica. Além disso, os diâmetros internos desses tubos devem ser adequados às vazões utilizadas. Tubos com diâmetro interno muito reduzido levam a um desnecessário aumento de pressão, além de maiores riscos de entupimento. Por outro lado, um diâmetro interno relativamente exagerado causa atraso do gradiente e, se depois do sistema de injeção, alargamento indesejado dos picos cromatográficos. Os tubos mais empregados nos sistemas convencionais são de aço inoxidável e têm 1/16” de diâmetro externo. Outro material muito utilizado para as tubulações de equipamentos em que se deseja maior inércia química (geralmente para biomoléculas) é o polieteretercetona (PEEK) também de 1/16” de diâmetro externo. Alguns sistemas de nano-HPLC e HPLC capilar apresentam tubulações mais finas com diâmetro externo de 1/32”, geralmente de PEEK revestido internamente por sílica fundida e podem apresentar diâmetros internos de poucos micrômetros. Um cuidado adicional refere-se aos conectores usado em HPLC. Nem todas as portas de conexões das diferentes marcas de cromatógrafos, válvulas e colunas apresentam as mesmas características. A escolha cuidadosa pode evitar desde o emperramento de conectores inadequados, até distorções cromatográficas como picos duplos, com cauda (*tailing*) ou com frontes (*fronting*) em virtude do excesso de volume morto entre o injetor e a coluna ou entre a coluna e o detector. Muitos conectores atuais podem e são suficientemente atarraxados com os próprios dedos. Em caso do emprego de chaves nas conexões, recomenda-se que a força utilizada não seja em demasia, geralmente ¼ de volta após a conexão ser atarraxada manualmente já é suficiente para evitar vazamentos. Um vazamento persistente costuma ser causado por incompatibilidade entre os conectores ou

conectores danificados. Um excesso de força pode causar a quebra de um conector e levar a necessidade de assistência técnica do fabricante.

Há diversos sistemas de injeção para HPLC, os mais encontrados atualmente são as válvulas manuais (em sistemas de menor custo) ou os injetores automáticos. No injetor manual, uma válvula de 6 vias e 2 posições permite que, com o auxílio de uma seringa, a alça de amostragem (*loop*) seja preenchida (totalmente ou parcialmente) pela amostra. Após essa etapa de carregamento da amostra (*load*), a válvula é comutada (girada) de maneira a introduzir a alça de amostragem na linha cromatográfica, posicionando-a entre o sistema de bombeamento e a coluna cromatográfica. Os maiores cuidados com relação ao procedimento de injeção manual concernem a uma adequada limpeza da válvula, entre as injeções, para evitar que efeitos de memória (*carry over*) sejam observados. Como todas peças móveis, os componentes da válvula têm uma vida útil e devem sofrer manutenção após um certo número de injeções. Um último cuidado consiste em não esquecer soluções corrosivas ou salinas no interior da válvula, uma vez que essas podem danificá-la seriamente. Os sistemas de injeção automática podem apresentar diferentes arranjos, cada qual com suas peculiaridades. Dentre os mais usados, alguns simplesmente mecanizam as mesmas funções que o operador executa na injeção manual, preenchendo a alça por meio do impulsionamento da amostra com uma seringa; outros preenchem a alça por meio da sucção da amostra até a alça; e um terceiro tipo tem a agulha de amostragem integrada à alça de amostragem. As velocidades de injeção e demais características dependem do tipo de sistema de injeção empregado pelo amostrador automático. Dentre os três tipos apresentados, o último é o mais moderno e o que geralmente apresenta maiores velocidades de injeção, bem como redução do efeito de memória. Obviamente, costumam ser os mais caros e com mais componentes para manutenção e fonte de problemas. Para um *troubleshooting* mais detalhado relacionado aos sistemas de injeção, uma melhor compreensão do funcionamento de cada um se faz necessária. Infelizmente, nesse momento, um detalhamento maior estenderia em demasia esta discussão. Material bem detalhado sobre os diversos sistemas de injeção pode ser encontrado na *web*.[4]

O injetor, como visto anteriormente, é o responsável pela inserção da amostra no sistema cromatográfico, permitindo que esta chegue até a coluna e tenha, idealmente, todos os seus componentes separados. Entretanto, a amostra, na maioria dos casos, só pode ser injetada depois de ter sido adequadamente preparada. O adequado tratamento da amostra envolve o emprego de diversas técnicas de preparo de amostras. Esses procedimentos são bastante especializados e merecem atenção detalhada desse periódico, podendo ser consultados na seção “Preparo de amostras”. Eventualmente, problemas que tenham relação com o preparo de amostras serão discutidos nessa coluna. Para o momento, o mais importante acerca da forma que a amostra deve encontrar-se para ser introduzida, refere-se a sua compatibilidade com a fase móvel empregada no início da corrida cromatográfica. Após adequadamente tratada, via de regra, a amostra deve estar solubilizada na fase móvel empregada no início da corrida. Como nem sempre isso é possível, alguns cuidados devem ser tomados, pois muitos problemas de distorção dos picos cromatográficos são causados por erros na introdução da amostra. Primeiramente, a amostra deve estar completamente solubilizada na solução de injeção, devendo ser preferencialmente filtrada, ou centrifugada, para a remoção de qualquer material particulado em suspensão. Caso a fase móvel seja muito diferente da solução a ser injetada, é importante verificar se a amostra não precipitará ao ser introduzida no sistema. De preferência, especialmente nos casos de grande volume de injeção, a força de eluição do solvente da amostra deverá ser menor do que aquele da fase móvel do início da corrida. Por exemplo, em injeções em fase reversa, a porcentagem de solvente orgânico da solução da amostra não deve superar, em muito, aquela da fase móvel. Um caso clássico de incompatibilidade é a injeção de soluções contendo 100% de acetonitrila ou metanol, em corridas em fase reversa iniciando com baixos teores de solvente orgânico na fase móvel. Todavia, as distorções nos picos cromatográficos são dependentes do método e dos analitos a serem separados, e podem estar ausentes em alguns casos.

Após ser adequadamente introduzida no sistema cromatográfico, deseja-se que a amostra atinja a coluna cromatográfica com o formato de uma banda o mais estreita possível. Esse formato depende, entre outras, da qualidade da injeção e da minimização do volume morto entre o injetor e a coluna. A coluna cromatográfica em HPLC, via de regra, é um tubo de aço inoxidável preenchido com a fase estacionária adequada. A diversidade de colunas cromatográficas é incalculável. Há colunas que variam em escala, desde diâmetros de poucos micrômetros até alguns centímetros, isso em equipamentos que podemos classificar como HPLC de bancada. Daí surge classificações que vão desde o

nano-HPLC até o HPLC preparativo. Quanto ao tipo de material de empacotamento é comum o emprego atual de partículas de sílica desde superiores a 10 µm de diâmetro em colunas preparativas até sub-2 µm para separações de altíssima eficiência; materiais poliméricos particulados ainda continuam sendo utilizados; bem como tem sido ampliado o uso de colunas monolíticas a base de sílica ou orgânicas, tanto em escala capilar quanto na convencional. Muitos problemas encontrados em separações cromatográficas têm causas que, de alguma forma, relacionam-se com a coluna cromatográfica. O perfeito entendimento de seu funcionamento depende também de conceitos teóricos que em momento adequado serão abordados. Para o momento, convém destacar que a coluna cromatográfica, exceto no caso de amostras muito limpas, merece algum tipo de proteção. Uma das causas mais comuns de perdas precoces de colunas cromatográficas, problemas de eficiência e distorção de picos cromatográficos relaciona-se com a obstrução do filtro de entrada, posicionado justapostamente no início da coluna. Esse filtro é referido como *frit*, em inglês, ou traduzido livremente como 'frita', em português. Algumas vezes, a sua obstrução pode ser resolvida com procedimentos de lavagem da coluna, e em colunas antigas, permitia-se inclusive a sua substituição; de qualquer maneira, a melhor forma de evitar-se esse tipo de problema é a prevenção. É muito divulgada a utilização de pré-colunas, as quais são posicionadas precedendo a coluna cromatográfica propriamente dita. Apesar de ser a forma de prevenção de problemas mais popularizada, em muitos casos, o uso de um filtro de linha, em vez da pré-coluna, surte os mesmos efeitos, ou ainda permite resultados superiores, em termos de menor alargamento dos picos. Maiores discussões sobre as vantagens e desvantagens de filtros de linhas ou pré-colunas ficam para outro momento, o fato é que ao menos um deles é recomendado para prolongar a vida da coluna. Um filtro de linha obstruído é facilmente substituído e tem um preço módico, enquanto colunas caras podem ser perdidas se estes não forem utilizados. Finalmente, as colunas, idealmente, são mantidas em um forno, para controle de temperatura. Apesar de variações na temperatura implicarem em diferentes tempos de retenção e seletividades, ao menos em escala convencional, não é viável a separação por programação de temperatura (como ocorre na cromatografia em fase gasosa). Outros dispositivos que podem requerer e apresentar controle de temperatura são os injetores automáticos e alguns detectores. O resfriamento das amostras é desejado para prolongar a sua conservação no interior do amostrador automático, enquanto o controle de temperatura de detectores, por exemplo, UV/Vis ou eletroquímico, é importante para aumentar a estabilidade da linha de base do cromatograma.

Sob condições ótimas, os componentes da amostra apresentam desiguais taxas de interação com a fase estacionária da coluna e são eluídos com diferentes tempos de retenção. Para que esses compostos sejam observados, há a necessidade de um sistema de detecção, que possibilite o registro na forma de picos em um cromatograma. Os picos registrados em um cromatograma fornecem uma ideia com relação à identidade dos compostos separados, e a área dos picos relaciona-se com a quantidade de cada composto. Atualmente, há uma gama muito grande de detectores que podem ser usados em um HPLC. O mais popular detector para HPLC é o UV/Vis, o qual pode ser encontrado também na forma mais sofisticada que emprega um arranjo de fotodiodos (comumente referido como DAD ou PDA, do inglês, *diode array detector* ou *photodiode array*), para detecção simultânea de todos os comprimentos de onda em um determinado intervalo do espectro UV/Vis. Outros detectores que podem ser encontrados, dependendo da especialidade do laboratório, são detectores de fluorescência, de índice de refração, de espalhamento de luz por evaporação (*evaporative light scattering detector*), de dicroísmo circular, eletroquímico e de condutividade. Equipamentos mais sofisticados e que constituem analisadores espectrométricos, em vez de meros detectores para cromatografia, são os espectrômetros de massas (MS) e os espectrômetros de ressonância magnética nuclear (NMR). Evidentemente, o primeiro grupo atualmente encontra um grau de divulgação muito maior do que o segundo, e equipamentos do tipo LC-MS/MS têm ganhado muito espaço e atenção nos laboratórios. Apesar de custo muito mais elevado do que o de um HPLC-UV, um LC-MS/MS, em todos os seus modos de análise, expande significativamente as fronteiras de atuação das técnicas cromatográficas. Detalhes sobre os cuidados e particularidades referentes ao acoplamento LC-MS fogem ao escopo deste artigo, mas eventualmente serão retomados em momentos mais oportunos. De maneira geral, todos os detectores requerem um certo tempo de estabilização, esse tempo pode ir de alguns minutos (detectores UV) até algumas horas (detectores eletroquímicos). Uma dica é aproveitar o tempo de estabilização para realizar o preparo das amostras a serem injetadas. Um detalhe que evita problemas em alguns detectores, geralmente

UV/Vis e de fluorescência, é a utilização de um tubo de descarte que gere certa pressão após a cela de detecção. Algumas vezes, o encurtamento do tubo de descarte, ou a simples eliminação dele para coleta de frações imediatamente após o detector, pode levar ao surgimento de bolhas que atrapalharão o cromatograma. A súbita despressurização após a coluna pode levar à insolubilização do gás dissolvido na amostra e o aparecimento de bolhas, que, em última instância, podem ficar retidas no detector causando artefatos no cromatograma. Um último alerta quanto a esse procedimento é a observação da pressão máxima suportada pela cela de detecção, do contrário esta pode apresentar vazamentos ou mesmo ser danificada.

Os sistemas cromatográficos atuais são controlados eletronicamente. Apesar de poder-se executar a grande maioria das funções pelo módulo ou interface de controle do equipamento, o meio mais utilizado é o controle via software, instalado em um computador. Além do controle do equipamento, o software comumente apresenta um pacote de funcionalidades para facilitar o tratamento e a interpretação dos dados, bem como a geração de relatórios e a exportação dos resultados. Dessa forma, um conhecimento rudimentar da eletrônica e informática relacionada ao sistema cromatográfico é desejado, uma vez que alguns problemas são aí localizados.

Atualmente, os sistemas cromatográficos permitem que injeções sejam programadas e o sistema monitorado à distância, tal facilidade permite que cromatógrafos trabalhem 24 horas processando as amostras. No caso de deixar o sistema em espera durante a noite, para que o mesmo método seja retomado no dia seguinte, recomenda-se deixar uma pequena vazão de fase móvel fluindo pelo sistema. Algo em torno de 10% da vazão normal já é suficiente, e para maior economia de fase móvel pode operar-se em modo de reciclagem de fase móvel. O detector e o restante dos módulos devem ficar desligados até o dia seguinte. Quando o sistema for desligar definitivamente, é importante fazer a limpeza de todas as linhas utilizadas e acondicioná-lo com solvente apropriado, bem como a coluna cromatográfica.

Concluindo, ao se adquirir experiência na operação rotineira de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, bem como ao se adquirir conhecimento técnico e teórico a respeito da HPLC, muitos desses procedimentos e observações tendem a tornarem-se intuitivos. O mais importante nas análises de rotina, por mais experiência que se tenha, é fazer tudo da mesma maneira e na mesma sequência, para que se obtenham resultados comparáveis.

Referências Bibliográficas

1. Dolan, J.W. and Snyder, L.R. Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation. Totowa, New Jersey: Humana Press. (1989) 500p.
2. Kromidas, S. Practical problem solving in HPLC. Weinhein: Wiley-VCH. (2000) 178p.
3. Coutinho, L.F.M. **Desenvolvimento de Instrumentação Dedicada a Cromatografia Líquida Capilar (cLC)**. 2008. 219 f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-05122008-171742/> Acesso em: 27 abr. 2009.
4. CHROMacademy. **HPLC Autosamplers.** Disponível em: <http://www.chromacademy.com/HPLC-Autosamplers/index.html> Acesso em: 27 abr. 2009.